

総 説

微生物由来の細胞接着阻害剤 Macrospheptide

高松 智

昭和大学薬学部 創薬分子薬学講座 生薬学・植物薬品化学部門

要 旨

現在使用されている医薬品の大半は天然に由来する低分子化合物、あるいはそれらの基本構造をもとに創製されたものである。それゆえ、天然物は今後も医薬品素材のシ-ズとしてリ-ドすることは疑う余地はない。様々な疾患に基づいた評価系すなわちスクリーニング系の構築と天然物の供給の中で思いがけない出会いが医薬品創製への道が開けることとなる。がん転移抑制を目的とした微生物由来の細胞接着阻害剤の探索が開始され、新規 16 員環 macrospheptide (MS) 類が見出された。MS 類はその新しい生物活性のみならず、その分子内に 3 つのエステル構造をもつユニークなマクロライド構造であることから、世界中の有機合成学者の注目を集めた。また、MS 類の全合成の過程で新たな抗がん剤としての作用がみつき、新たな展開が始まっている。本総説では MS 類の発見の経緯、生物活性、全合成、そして近況について報告する。

キーワード：細胞接着、がん転移、HUVEC、HL-60、macrospheptide

はじめに

生体内では細胞同士が強く結合(細胞-細胞間接着)し、個々の細胞は細胞外基質、または結合組織と結合(細胞-細胞外基質間接着)することにより個体が形成される。細胞接着分子は細胞表面に存在する糖タンパク質で、細胞間の接着、運動、移動、増殖、分化、情報伝達など細胞の基本的な活動の調節や血液凝固、創傷治癒、免疫異常、がん転移などの生命現象に深く関与することが知られている。

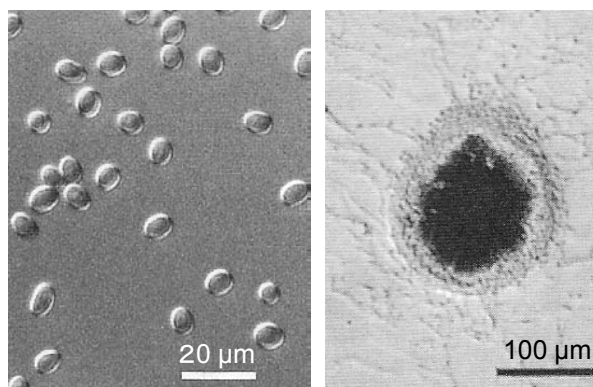
がん転移と細胞接着分子の関係が明らかにされる中、原発巣で増殖したがん細胞は、血管を経由する場合、血管内に浸潤し、血流に乗って移動し、標的臓器への血管内壁に細胞接着し、血管内壁の組織間質に浸潤し増殖する。この過程において、がん細胞ならびに血管内皮細胞表面にはいくつかの細胞接着分子が発現し、重要な働きを担っていることが接着因子抗体を用いた研究から明らかに

なっている¹⁻³⁾。

そこで新たな作用機序をもつ薬剤の創製を目的にヒト急性前骨髄白血病細胞HL-60とヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)間の細胞接着モデルを用いて微生物代謝産物を対象にその阻害剤を探索した。その結果、南伊豆の土壌より分離した糸状菌*Microspheptopsis* sp. FO-5050株(図1)の培養液よりmacrospheptide (MS)と命名した新規マクロライド系化合物 (MS A-B)を見いだした(図2)。

1. TNF 活性化による HUVEC への HL-60 細胞接着への経時変化

Tumor Necrosis Factor (TNF)刺激による活性化HUVECへのHL-60細胞の接着を検討したところ、図3に示すように、刺激後5時間前後と20時間前後にHL-60細胞の接着の二相性のピークが見られた。また、lipopolysaccharide (LPS)を用いてHUVECを刺激した場合もTNFと同様な接



(a) conidia

(b) pycnidium

図1. *Microsphaeropsis* sp. FO-5050 の分生子 (a), および分生子果 (b) の光学顕微鏡写真

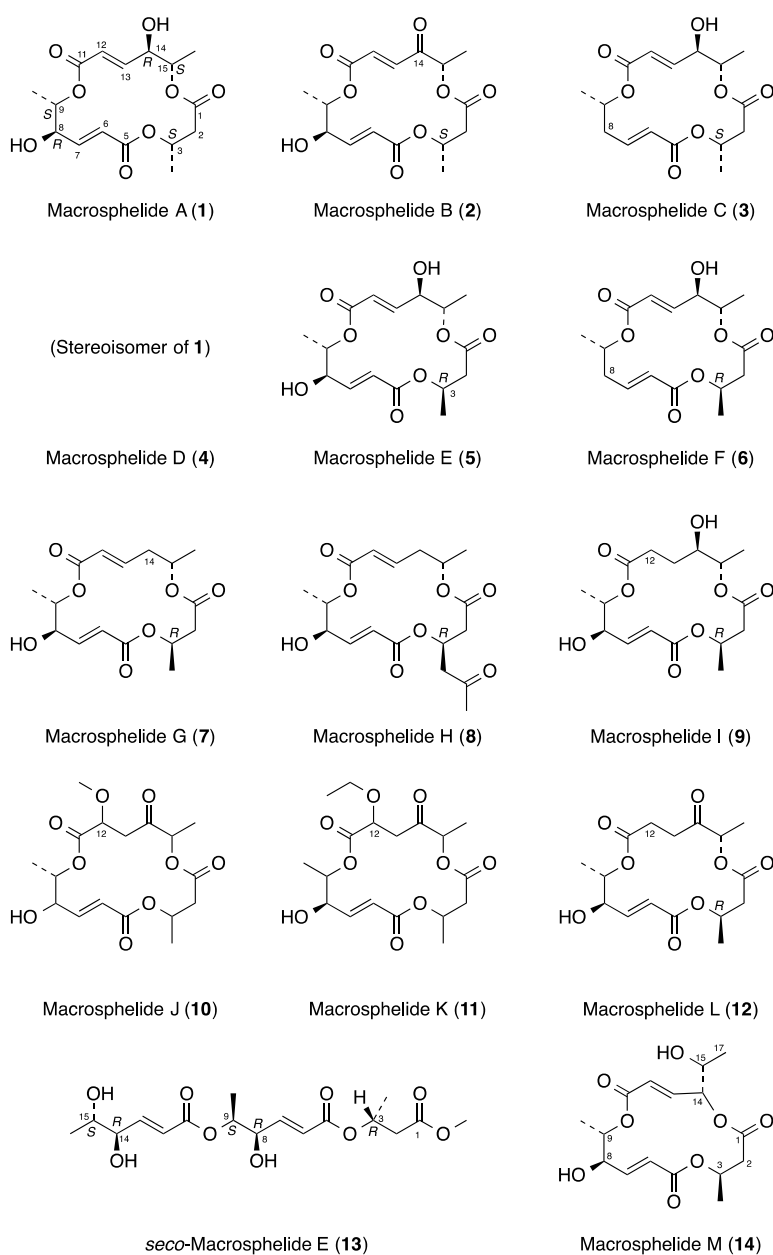


図2. Macrospheptide 類の化学構造

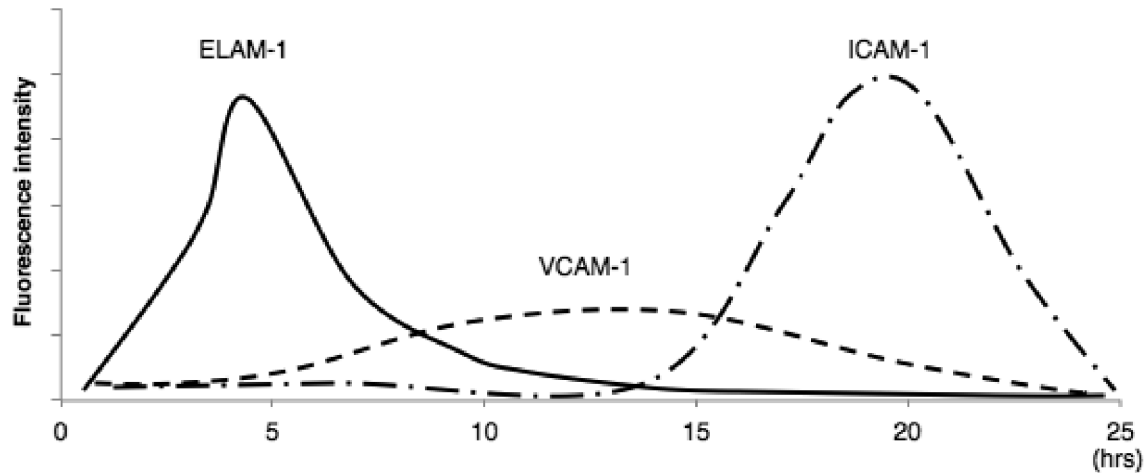


図3. TNF 刺激による HUVEC 細胞における細胞接着分子の経時変化

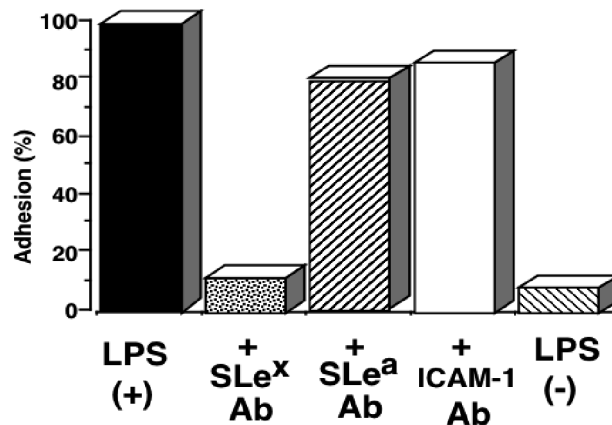


図4. 各細胞接着分子種抗体による接着阻害効果

着パターンを示した。そこで、2つのピークがどの接着分子に起因するか各種抗体を用いて解析した。刺激後約20時間後の細胞接着は抗LFA-1、抗ICAM-1の各抗体処理で抑制が見られた。一方、刺激後5時間前後での細胞接着は抗LFA-1や抗ICAM-1抗体処理では抑制されなかった。そこで、同条件で各種抗体を検討したところ、抗sialyl lewis^x (sLe^x)抗体、抗ELAM-1抗体処理によりHL-60細胞のHUVECへの接着抑制が見られた(図4)。以上の結果より、HUVECは刺激後、5時間前後ではELAM-1、16～20時間前後でICAM-1の発現を介した接着がピークとなる二相性を示すことが明らかとなった(図3)。

2. スクリーニングによる細胞-細胞接着阻害剤の探索

上記接着分子の発現結果より、LPS刺激後4時間での接着阻害物質の探索を開始した。土壌より

分離された930種の微生物培養液をスクリーニングしたところ、南伊豆の土壌より分離した糸状菌FO-5050株(図1)の培養液より4種の細胞接着阻害剤を見いだした。これらの化合物はいずれも新規な16員環マクロライド類縁体で、それらの生産菌が*Microsphaeropsis*属と同定されたことにちなんで、macrospheptide A, B, C, D (MS A, B, C, D)と命名された(図2)⁴⁻⁶⁾。それらの構造はこれまでのマクロライドでは報告されていない、分子内に3つのエステル結合を有するユニークな新規16員環体(triester-macrolide)であった。その後、同培養液より2種の新規類縁体MS-JおよびMS-Kが見出された(図2)⁷⁾。

3. 培養・単離および構造決定

生産菌 FO-5050株を生産培地(1% D-glucose, 0.3% yeast extract, 0.5% trypton, 0.3% maltose,

0.1% agar, pH 6.5, 5 L, 27℃)で5日間培養し、得られた培養液を酢酸エチルで抽出後、順相系SiO₂, 逆相系HPLCを併用しMS類を得た。個々の構造は各種機器スペクトルデータの解析により決定した。いずれの化合物も分子内に3つのエステル構造を有する初めての16員環マクロライド (macrotriolide) 体であった。MS-Aについては、X線結晶構造解析やMosher法により絶対立体配置も含めその構造が明らかになった⁸⁾。

4. 接着阻害活性

Macrosphelide類 (MS A-D) の細胞接着阻害活性を上記のアッセイ系を用いて検討した。10分間の前処理によりMS A-Dは各々、LPS刺激HUVECへのHL60細胞の接着を用量依存的に阻害した(図5)。MS A-DのIC₅₀値は各々、3.5, 36,

67.5, 25 μ Mであった⁴⁻⁶⁾。さらに、MS-Aは1000 μ g/mLでグラム陽性菌、グラム陰性菌、カビ、酵母等に対する抗菌活性は示さなかった。更に100 μ g/mLの濃度でHeLa細胞, B16 melanoma, リンパ腫細胞, 血管内皮細胞等に対する細胞障害性も認められなかった。一方、MS-J及び-Kには細胞接着阻害活性は認められなかった⁷⁾。

5. 作用機序

TNFまたはLPSによる活性化されたHUVECに対し、HL-60細胞の接着は5時間後と20時間後にピークを示した。先の実験より、5時間後の細胞接着はHL-60細胞上のsialyl lewis^x (sLe^x)やsialyl lewis^a (sLe^a)とHUVEC上に発現したELAM-1によることが判明している。MS類はこの5時間での細胞間接着を阻害したことから、その細胞

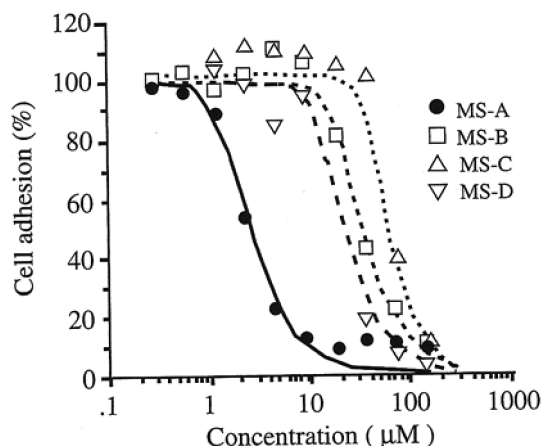


図5. Macrosphelides A-D の細胞接着阻害効果

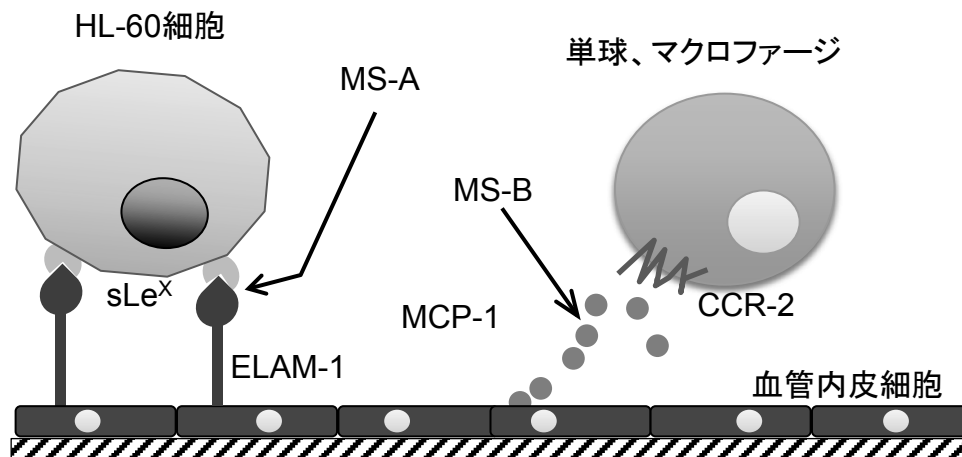


図6. Macrosphelide A 及び B の作用部位

接着阻害作用は sLe^x や sLe^a の糖鎖抗原とELAM-1との結合阻害によることが強く示唆された。また、MS-Aで10分間前処理したHL-60細胞のみHUVECへの接着が抑制されたこと、さらにMS-Aは sLe^a /ELAM-1間の接着には影響を示さないのに対し、 sLe^x /ELAM-1の接着を阻害したことから、その作用点はELAM-1の sLe^x 認識部位であることが判明した(図6)⁹⁾。

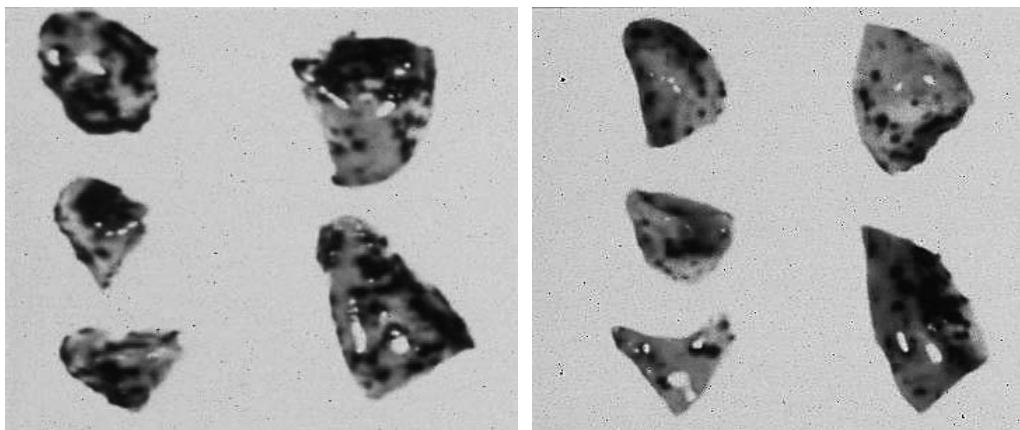
6. 転移阻害作用

B16/BL6細胞のマウス肺転移モデルにおいて、隔日でMS-Aを5-50 mg/kg腹腔内投与すると、体重減少を示すことなく肺への転移結節数は用量依存的に抑制され、 sLe^x とELAM-1の結合を阻害することが裏付けられた。一方、MS-B (成分A の14 位ケト体)は、20 mg/kg/dayの投与で有意な転移阻害を示し(図7)、抗がん剤シスプラ

チン(CDDP)との併用でさらに顕著な有効性が示された(図8)。また、MS-Bは、同種同系(ddY/ddY)及び同種異系(ddY/C57BL)マウス間での皮膚移植に対する拒絶反応の抑制が認められ、免疫抑制作用を示すことが明らかとなった。その作用機序はFK506 やシクロスポリンA とは異なり、ケモカインのMCP-1/CCR-2 間の結合を強力にかつ選択的に阻害することが示された(図6)⁹⁾。

7. 海洋生物由来の真菌の生産する macrosphelide 類

MS-AとMS-Bが発見されたほぼ同時期に、沼田らは海洋生物由来菌類の抗腫瘍性代謝産物の探索研究の一環として、アメフラシ由来真菌*Periconia byssoides* OUPS-N133の代謝産物について検討し、計10種のMS誘導体 (C, E, F, G, H^{10,11)}, A, I, L^{11,12)}, Eのメチルエステル体¹³⁾, M¹⁴⁾を単離してい



コントロール (non treated)

MS-B (20 mg/kg/day, i. p.)

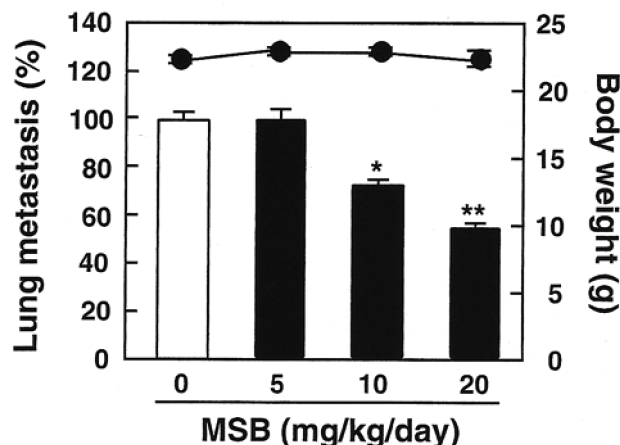


図7. Macrosphelide B の B16/BL6 転移阻害効果

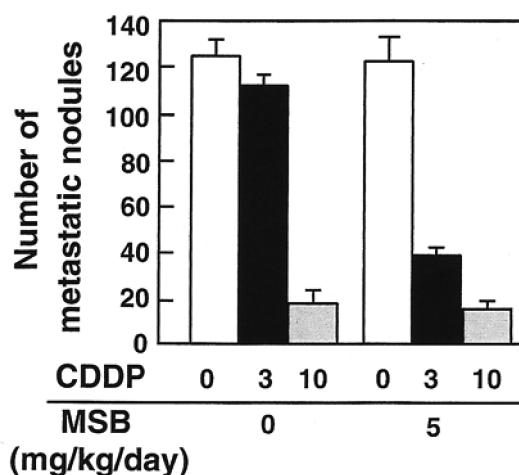


図8. Macrosphelide B とシスプラチン (CDDP) の併用効果

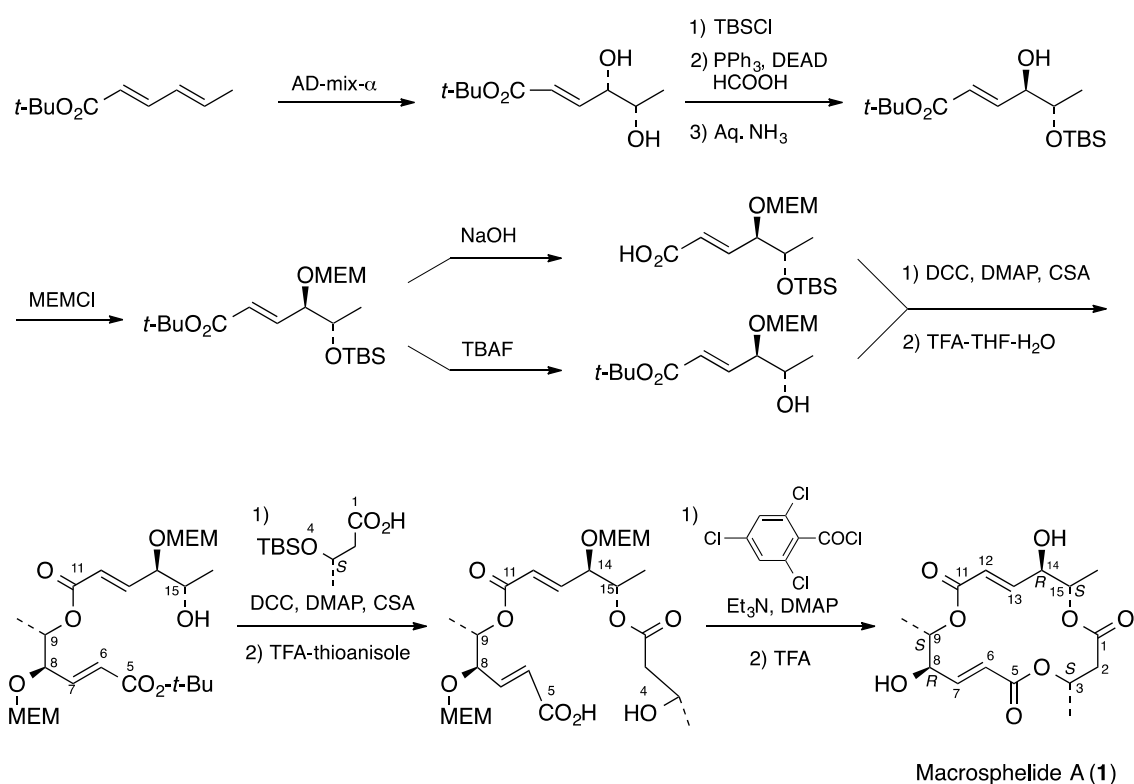


図9. Macrosphelide A の全合成ルート

る (図2). これらの中で, C, E, F, G, H, L 体が細胞接着阻害活性を有することを確認している^{10, 11)}.

8. 全合成

がん細胞の転移に関わる細胞接着阻害というインパクトのある生物活性に加え, 分子内に3つのエステル結合を持つ16員環マクロライドである macrosphelide の独特の構造は有機合成学者の注目を集めた. まず, 最初の全合成は筆者の所属す

る北里研究所 (現, 北里大学生命科学研究所) の砂塚らのグループにより達成された. まず, ソルビン酸を出発原料とし, 位置選択的な不斉ジヒドロキシル化, 光延反転, マクロラクトン化を鍵反応として計11ステップ, 全収率19%でMS-Aの全合成ルートが確立された (図9)⁸⁾. その後, 国内では小林ら¹⁵⁻¹⁹⁾, 秋田ら²⁰⁻²⁴⁾, 高橋ら²⁵⁾, 松谷ら^{26, 27)}が, また海外ではインド²⁸⁻³²⁾, 韓国³³⁻³⁶⁾, 中国³⁷⁾, 米国³⁸⁾と合わせて8つのグループがMS類の全合成を報告している.

9. 全合成から新たな展開

天然物類縁体ライブラリーの構築は、医薬品開発のリード化合物として、また、生物機能の解明のためのバイオプローブの開発や構造活性相関の解明において寄与するものと考えられる。

高橋らは固相合成法を駆使し、多様性と活性スクリーニングを戦略目的に、計128種のMS類縁体のコンビナトリアル合成に成功している³⁹⁾。

また、松谷らはMS類の全合成研究の一環として、それらにヒトリンバ腫細胞株U937に対しアポトーシス誘導活性を見出し、MS類が細胞内酸化ストレスを誘発することによるアポトーシス誘導のシグナル経路を特定している。また、これらの一部の化合物に温熱誘発アポトーシスの増強効果を見出している。さらに抗がん剤エポチロンとの骨格構造の類似性に着目し、活性発現の鍵となるチアゾール側鎖とMS骨格を融合させたハイブリット体を設計するなど、より強力なアポトーシス誘導活性に特化している^{40, 41)}。

おわりに

このようにMS類は当初の抗炎症やがん転移剤の開発という目的の他、新たにアポトーシス誘導活性が見出され新たな展開が進められている。MS生産菌はここで紹介した2種の糸状菌の他に、最近地衣類などからの単離報告があり⁴²⁾、またMS類の抗菌活性^{43, 44)}なども報告されている。

同一の化合物ながら細胞接着阻害やアポトーシス誘導作用を持ち合わせたmacrospheptideの構造は、合成科学者や生物科学者にとって魅力ある化合物であることは確かであり、今後より詳細な作用機序の検討がなされ、医薬品としての開発が望まれる。

謝 辞

本総説で紹介したmacrospheptideに関する研究は、筆者が以前に所属していた(社)北里研究所(現 北里大学北里生命科学研究所)において、大村 智 博士、小宮山 寛機 博士、林 正彦 博士の指導のもと、多くの研究員と共に行われたものです。お世話になった方々に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Lauri, D., Needham, L., Martin-Padura, I., et al.: Tumor cell adhesion to endothelial cells: endothelial leukocyte adhesion molecule-1 as an inducible adhesive receptor specific for colon carcinoma cells, *J. Natl. Cancer. Inst.*, 83, 1321-1324 (1991).
- 2) Nelson, H., Ramsey, P.S., Donohue, J.H., et al.: Cell adhesion molecule expression within the microvasculature of human colorectal malignancies, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 72, 129-136 (1994).
- 3) Huang, Y.W., Richardson, J.A., Vitetta, E.S.: Anti-CD54 (ICAM-1) has antitumor activity in SCID mice with human myeloma cells, *Cancer. Res.*, 55, 610-616 (1995).
- 4) Hayashi, M., Kim, Y.P., Hiraoka, H., et al.: Macrospheptide, a novel inhibitor of cell-cell adhesion molecule. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities, *J. Antibiot.*, 48, 1435-1439 (1995).
- 5) Takamatsu, S., Kim, Y.P., Hayashi, M., et al.: Macrospheptide, a novel inhibitor of cell-cell adhesion molecule. II. Physicochemical properties and structural elucidation, *J. Antibiot.*, 49, 95-98 (1996).
- 6) Takamatsu, S., Hiraoka, H., Kim, Y.P., et al.: Macrospheptides C and D, novel inhibitors of cell adhesion, *J. Antibiot.*, 50, 878-80 (1997).
- 7) Fukami, A., Taniguchi, Y., Nakamura, T., et al.: New members of the macrospheptides from *Microspheptopsis* sp. FO-5050 IV, *J. Antibiot.*, 52, 501-504 (1999).
- 8) Sunazuka, T., Hirose, T., Harigaya, Y., Takamatsu, T., et al.: The relative and stereochemistries and total synthesis of (+)-macrospheptides A and B, potent orally bioavailable inhibitors of cell-cell adhesion molecule, *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 10247-

- 10248 (1997).
- 9) Fukami, A., Iijima, K., Hayashi, M., et al.: Macrophelide B suppressed metastasis through inhibition of adhesion of sLe^x/E-selectin molecules, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 291, 1065-1070 (2002).
- 10) Numata, A., Iritani, M., Yamada, T., et al.: Novel antitumour metabolites produced by a fungal strain from a sea hare, *Tetrahedron Lett.*, 38, 8215-8218 (1997).
- 11) Yamada, T., Iritani, M., Doi, M., et al.: Absolute stereostructures of cell-adhesion inhibitors, macrophelides C, E-G and I, produced by a *Periconia* species separated from an *Aplysia* sea hare, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 3046-3053 (2001).
- 12) Yamada, T., Iritani, M., Minoura, K., et al.: Absolute stereostructures of cell adhesion inhibitors, macrophelides H and L, from *Periconia byssoides* OUPS-N133, *J. Antibiot.*, 55, 147-154 (2002).
- 13) Nakamura, H., Ono, M., Yamada, T., et al.: Determination of the absolute stereostructure of seco-macrophelide E produced by a fungal strain from a sea hare, *Chem. Pharm. Bull.*, 50, 303-306 (2002).
- 14) Yamada, T., Minoura, K., Tanaka, R., et al.: Cell-adhesion inhibitors produced by a sea hare-derived *Periconia* sp., *J. Antibiot.*, 60, 370-375 (2007).
- 15) Kobayashi, Y., Kumar, B.G., Kurachi, T.: Total synthesis of macrophelides B and A, *Tetrahedron Lett.*, 41, 1559-1563 (2000).
- 16) Kobayashi, Y.: Synthesis of macrocyclic natural products possessing a trans 4-oxygenated 2-alkenoic acid moiety by a two-step oxidation of 2-substituted furans, *Recent Res. Devel. Org. Chem.*, 4, 169-182 (2000).
- 17) Kobayashi, Y., Kumar, G.B., Kurachi, T., et al.: Furan ring oxidation strategy for the synthesis of macrophelides A and B, *J. Org. Chem.*, 66, 2011-2008 (2001).
- 18) Kobayashi, Y., Acharya, H.P.: First total synthesis of macrophelides C and F, *Tetrahedron Lett.*, 42, 2817-2820 (2001).
- 19) Kobayashi, Y., Wang, Y.G.: Synthesis of macrophelides H and G, *Tetrahedron Lett.*, 43, 4381-4384 (2002).
- 20) Ono, M., Nakamura, H., Konno, F., et al.: Total syntheses of macrophelides (+)-A, (-)-A and (+)-E, *Tetrahedron Asymmetry*, 11, 2753-2764 (2000).
- 21) Nakamura, H., Ono, M., Makino, Mi., et al.: Formal total synthesis of macrophelide (+)-A, effect on macrolactonization depended upon the lactone formation position, *Heterocycles*, 57, 327-336 (2002).
- 22) Ono, M., Nakamura, H., Arakawa, S., et al.: Formal total synthesis of (+)-macrophelide A based on regioselective hydrolysis using lipase, *Chem. Pharm. Bull.*, 50, 692-696 (2002).
- 23) Nakamura, H., Ono, M., Shida, Y., et al.: New total syntheses of (+)-macrophelides C, F and G, *Tetrahedron Asymmetry*, 13, 705-713 (2002).
- 24) Akita, H., Nakamura, H., Ono, M.: Total synthesis of (+)-macrophelides A, C, E, F, and G based on enzymatic function, *Chirality*, 15, 352-359 (2003).
- 25) Kusaka, S., Dohi, S., Doi, T., et al.: Total synthesis of macrophelide A by way of palladium-catalyzed carbonylative esterification, *Tetrahedron Lett.*, 44, 8857-8859 (2003).
- 26) Kawaguchi, T., Funamori, N., Matsuya, Y., et al.: Total synthesis of macrophelides A, B, and E: first application of ring-closing metathesis for macrophelide synthesis, *J. Org. Chem.*, 69, 505-509 (2004).
- 27) Matsuya, Y., Nemoto, H.: Recent advances in macrophelide synthesis, *Heterocycles*, 65, 1741-1749 (2005).

- 28) Sharma, G.V.M., Mouli, C.C.: The total synthesis of macrosphelides A and E from carbohydrate precursors, *Tetrahedron Lett.*, 43, 9159-9161 (2002).
- 29) Sharma, G.V.M., Mouli, C.C.: A total synthesis of macrosphelides C and F from L-(+)-arabinose, *Tetrahedron Lett.*, 44, 8161-8163 (2003).
- 30) Rao, S.K., Mukkanti, K., Reddy, S.D. et al.: A simple procedure for the synthesis of γ -hydroxy- α, β -(E)-alkenoic esters: formal synthesis of (+)-macrosphelides A and B, *Tetrahedron Lett.*, 46, 2287-2290 (2005).
- 31) Sharma, G.V.M., Babu, K.V.: RCM mediated synthesis of macrosphelides I and G, *Tetrahedron Asymmetry*, 18, 2175-2184 (2007).
- 32) Sharma, G.V., Reddy, P.S.: Total Synthesis of Macrosphelide M from Diacetone Glucose, *Eur. J. Org. Chem.*, 2012, 2414-2421 (2012).
- 33) Paek, S.M., Seo, S.Y., Kim, S.H., et al.: Concise syntheses of (+)-macrosphelides A and B, *Org. Lett.*, 7, 3159-3162 (2005).
- 34) Paek, S.M., Yun, H., Kim, N.J., et al.: Concise syntheses of (+)-macrosphelides A and B: studies on the macro-ring closure strategy, *J. Org. Chem.*, 74, 554-561 (2009).
- 35) Yun, H., Paek, S.M., Jung, J.W., et al.: First total syntheses of (-)-macrosphelides J and K and elucidation of their absolute configuration, *Chem. Commun. (Camb.)*, 14, 2463-2465 (2009).
- 36) Paek, S.M., Suh, Y.G.: Synthetic studies on bioactive natural polyketides: intramolecular nitrile oxide-olefin cycloaddition approach for construction of a macrolactone skeleton of macrosphelide B, *Molecules*, 16, 4850-6480 (2011).
- 37) Wang, B.L., Jiang, Z.X., You, Z.W. et al.: Total synthesis of trifluoromethylated analogs of macrosphelide A, *Tetrahedron*, 63, 12671-1268 (2007).
- 38) Curran, D.P., Sinha, M.K., Zhang, K., et al.: Binary fluorous tagging enables the synthesis and separation of a 16-stereoisomer library of macrosphelides, *Nat. Chem.*, 4, 124-9 (2012).
- 39) Takahashi, T., Kusaka, S., Doi, T., et al.: A combinatorial synthesis of a macrosphelide library utilizing a palladium-catalyzed carbonylation on a polymer support, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 42, 5230-4523 (2003).
- 40) Matsuya, Y., Nemoto, H.: Artificial macrosphelides as a novel apoptosis-inducing compound, *Heterocycles*, 81, 57-66 (2010).
- 41) Sugimoto, K., Kobayashi, Y., Kondo, T. et al.: Dihydroazamacrosphelides: synthesis and apoptosis inducing activities, *Heterocycles*, 83, 2823-2835 (2011).
- 42) Ivanova, V., Kolarova, M., Aleksieva, K., et al.: Diphenylether and macrotriolides occurring in a fungal isolate from the antarctic lichen *Neuropogon*, *Prep Biochem. Biotechnol.*, 37, 39-45 (2007).
- 43) McQuilken, M.P., Gemmell, J., Hill, R.A., Whipps, J.M.: Production of macrosphelide A by the mycoparasite *Coniothyrium minitans*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 219, 27-31 (2003).
- 44) Tomprefa, N., McQuilken, M.P., Hill, R.A., et al.: Antimicrobial activity of *Coniothyrium minitans* and its macrolide antibiotic macrosphelide A, *J. Appl. Microbiol.*, 106, 2048-2056 (2009).

Macrosphelides, cell – cell adhesive inhibitor of microbial origin

Satoshi Takamatsu

Division of Pharmacognosy & Phytochemistry, Department of
Medical Chemistry, School of Pharmacy, Showa University

Abstract

Most of medicines currently used had been developed based on naturally occurring small molecules. Therefore, natural products are still of particular interest as seeds for drug discovery. A variety of screening methods on the basis of disorders encounter natural products, which have made possible to pave the way for drug development.

In the course of a screening program aimed at cell adhesive inhibitors of microbial origin for metastasis suppression, new macrocyclic compounds, macrosphelides were discovered in the culture of a fungal strain *Microsphaeropsis* sp. FO-5050. Macrosphelides are the first 16-membered-ring microbial metabolite embodying three ester linkages and showed anti-cell-adherent activity. Therefore, macrosphelides became a target for total synthesis around the globe. Recently, new biological activity of macrosphelides has been reported, which brings a new dimension. In the paper, the discovery, biological activity and total synthesis of macrosphelides, and their recent history are described.

Key words : cell adhesion molecule, metastasis, HUVEC, HL-60, macrosphelide

Received 11 May 2013 ; accepted 29 May 2013